

Генетические аспекты неинфекционного эндокардита у пациентов с антифосфолипидным синдромом

Ю.С. Бахарева¹, В.Н. Максимов^{1, 2}, Н.Н. Чапаева²

¹Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

АННОТАЦИЯ

Введение. Антифосфолипидный синдром (АФС) представляет собой аутоиммунную тромбофилию, при которой у пациентов с клиническими критериями рецидивирующих артериальных и венозных тромбозов и/или патологией беременности обнаруживают положительные результаты лабораторных исследований на наличие антифосфолипидных антител (АФЛ). Генетическая предрасположенность к неинфекционному эндокардиту (НЭ) у пациентов с АФС остается сложной и малоизученной проблемой.

Цель. Выявление возможных ассоциативных связей между полиморфизмами генов-кандидатов и эндокардитом неинфекционного генеза у пациентов с АФС, а также развитием возможных тромбоэмболических осложнений.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 35 пациентов в возрасте 43.0 ± 13.9 года. При этом основными признаками, характеризующими НЭ при АФС, являлись отрицательная гемокультура, нормотермия и отсутствие явных эхокардиографических признаков инфицирования (утолщение и уплотнение створок клапанов, минимальная регургитация). Изучены полиморфизмы 18 генов в качестве возможных молекулярно-генетических маркеров развития и/или протекции НЭ у 35 пациентов с АФС: первичный диагностирован у 15 пациентов (18.5 %), вторичный – у 20 пациентов с аутоиммунной патологией (24.7 %).

Результаты. Впервые для полиморфизмов rs6025 (1691 G>A) гена *F5*, 4a/4b гена *NOS3*, rs1800795 гена *IL6*, rs1805087 (2756 A>G) гена *MTR* выявлена достоверная ассоциативная связь с развитием вегетаций на клапанном аппарате сердца при АФС. Для 2 полиморфизмов – rs1126643 (807 C>T) гена *ITGA2* и rs1799889 (-675 5G>4G) гена *PAI1* (*SERPINE1*) выявлена ассоциация с тромбоэмболическими осложнениями (острое нарушение мозгового кровообращения) при НЭ.

Заключение. Целесообразно проводить генотипирование некоторых однонуклеотидных полиморфизмов у пациентов с АФС.

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром, гены-кандидаты, однонуклеотидный полиморфизм, гемостаз, тромбоэмболические осложнения.

Образец цитирования: Бахарева Ю.С., Максимов В.Н., Чапаева Н.Н. Генетические аспекты неинфекционного эндокардита у пациентов с антифосфолипидным синдромом // Journal of Siberian Medical Sciences. 2022;6(2):51–61. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-6-2-51-61

Genetic aspects of non-infectious endocarditis in patients with antiphospholipid syndrome

Yu.S. Bakhareva¹, V.N. Maksimov^{1, 2}, N.N. Chapaeva²

²Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

Introduction. Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune thrombophilia in which patients with clinical criteria for recurrent arterial and venous thrombosis and/or pregnancy failure show positive laboratory results for the

Поступила в редакцию 28.10.2021
Прошла рецензирование 28.12.2021
Принята к публикации 01.02.2022

Автор, ответственный за переписку
Бахарева Юлия Сергеевна: НИИ терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН». 630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1.
E-mail: 8578511@inbox.ru

Received 28.10.2021
Revised 28.12.2021
Accepted 01.02.2022

Corresponding author
Yulia S. Bakhareva: Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, 175/1, B. Bogatkova str., Novosibirsk, 630089, Russia.
E-mail: 8578511@inbox.ru

presence of antiphospholipid antibodies (aPL). The genetic predisposition to non-infectious endocarditis (NIE) in patients with APS remains a complex and poorly understood problem.

A i m . Revealing of possible associations between polymorphisms of candidate genes and non-infectious endocarditis in patients with APS, as well as the development of possible thromboembolic complications.

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . The study involved 35 patients aged 43.0 ± 13.9 years. At the same time, the main signs characterizing NIE in APS were negative blood culture, normothermia, and the absence of obvious echoscopic signs of infection (thickening and induration calcification of the valve leaflets, minimal regurgitation). Polymorphisms of 18 genes were studied as possible molecular genetic markers for the development and/or protection of NIE in 35 patients with APS: the primary disorder was diagnosed in 15 patients (18.5%), secondary – in 20 patients with autoimmune pathology (24.7%).

R e s u l t s . For the first time, for polymorphisms rs6025 (1691 G>A) of the *F5* gene, 4a/4b of the *NOS3* gene, rs1800795 of the *IL6* gene, rs1805087 (2756 A>G) of the *MTR* gene, a significant association with the development of vegetations on the valvular heart apparatus in APS was revealed. Two polymorphisms, rs1126643 (807 C>T) of the *ITGA2* gene and rs1799889 (-675 5G>4G) of the *PAI1* gene (*SERPINE1*), were found to be associated with thromboembolic complications (acute cerebrovascular accident) in NIE.

C o n c l u s i o n . It is reasonable to perform genotyping of some single nucleotide polymorphisms in patients with APS.

Keywords: antiphospholipid syndrome, candidate genes, single nucleotide polymorphism, hemostasis, thromboembolic complications.

Citation example: Bakhareva Yu.S., Maksimov V.N., Chapaeva N.N. Genetic aspects of non-infectious endocarditis in patients with antiphospholipid syndrome. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2022;6(2):51–61. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-6-2-51-61

ВВЕДЕНИЕ

Антифосфолипидный синдром (АФС), впервые изученный и описанный в начале 1980-х годов, представляет собой аутоиммунную тромбофилию, при которой у пациентов с клиническими критериями рецидивирующих артериальных и венозных тромбозов и/или патологией беременности обнаруживают положительные результаты лабораторных исследований на наличие антифосфолипидных антител (АФЛ) [1]. Для верификации диагноза АФС достаточно наличие одного клинического критерия: тромбоз сосудов или акушерская патология и одного лабораторного: обнаружение волчаночного антикоагулянта (ВА), антител к кардиолипину (АКЛ) и/или антител к бета-2-гликопротеину I ($\beta 2$ -ГПИ) [2]. Клинические проявления, не входящие в общепризнанные классификационные критерии, включают в себя: неврологические (хорея, миелит и мигрень) и гематологические (тромбоцитопения и гемолитическая анемия) симптомы, ретикулярное ливедо, нефропатию и поражение клапанов сердца – неинфекционный эндокардит (НЭ) [3]. Первоначально АФС был описан у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) – выявляется примерно у 7–15 % пациентов и ассоциируется с более тяжелым течением, но также может возникать и у пациентов без аутоиммунных заболеваний – первичный АФС [4].

Патофизиологические механизмы, лежащие в основе тромбоза и акушерской патологии при

INTRODUCTION

Antiphospholipid syndrome (APS), first studied and described in the early 1980s, is an autoimmune thrombophilia in which patients with clinical criteria for recurrent arterial and venous thrombosis and/or pregnancy failure show positive laboratory results for the presence of antiphospholipid antibodies (aPL) [1]. To verify the diagnosis of APS, it is sufficient to have one clinical criterion – vascular thrombosis or obstetric pathology, and one laboratory criterion – detection of lupus anticoagulant (LA), anticardiolipin antibodies (aCL) and/or anti-beta-2-glycoprotein I ($\beta 2$ -GPI) antibodies [2]. Clinical manifestations that do not correspond to the generally accepted classification criteria include: neurological (chorea, myelitis and migraine) and hematological (thrombocytopenia and hemolytic anemia) symptoms, livedo reticularis, nephropathy and heart valve disease – non-infectious endocarditis (NIE) [3]. Initially, APS was described in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) – it is detected in approximately 7–15% of cases and is associated with a more severe course, but it can also occur in patients without autoimmune diseases – primary APS [4].

The pathophysiological mechanisms of thrombosis and obstetric pathology in APS are due to the inhibition of factors of the hemostasis and fibrinolysis system, as well as the activation of the complement system [5]. Complement system is a complex of enzymes and regulatory proteins of the innate immune system that plays a key role in the develop-

АФС, обусловлены ингибированием факторов системы гемостаза и фибринолиза, а также активацией системы комплемента [5]. Комплемент – это система ферментов и регуляторных белков врожденной иммунной системы, которая играет ключевую роль в развитии воспалительной реакции. Пути комплемента и коагуляции между собой тесно связаны, комплемент может активироваться у пациентов с АФС и действовать как кофактор в патогенезе тромбозомболических осложнений [6]. Хотя механизмы активации комплемента при АФС полностью не изучены, предполагают, что активация комплемента антителами к фосфолипидам приводит к расщеплению C5 с образованием активированных факторов C5a и C5b; C5a способствует выработке тканевого фактора нейтрофилами, что, в свою очередь, обуславливает прокоагулянтную способность и угнетает фибринолиз [7, 8].

Генетическая предрасположенность к НЭ у пациентов с АФС остается сложной и малоизученной проблемой. Сообщается об ассоциативных связях DR или DQ (группы антигенов гистосовместимости) с развитием АФС и генетических рисках продукции АКЛ в случае полиморфизма $\beta 2$ -ГПИ с заменой валина (247) на лейцин [9]. Имеется небольшой объем данных относительно ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов в генах гемостаза и фолатного цикла с развитием эндокардитов при АФС [10, 11].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявление возможных ассоциативных связей между полиморфизмами 18 генов-кандидатов и эндокардитом неинфекционного генеза у пациентов с АФС, а также развитием возможных тромбозомболических осложнений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 35 пациентов (32 женщины, 3 мужчины) в возрасте 43.0 ± 13.9 года с НЭ. При этом основными признаками, характеризующими НЭ при АФС, являлись отрицательная гемокультура, нормотермия и отсутствие явных эхоскопических признаков инфицирования (утолщение и уплотнение створок клапанов, минимальная регургитация). Первичный АФС диагностирован у 15 пациентов (18.5 %), вторичный – у 20 пациентов с аутоиммунной патологией (24.7 %). Критерии включения в исследование: наличие эндокардита при АФС. Все пациенты были осмотрены и обследованы на предмет аутоиммунной патологии (АФС, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, склеродер-

мент of the inflammatory response. Complement and coagulation pathways are closely related to each other; complement can be activated in patients with APS and act as a cofactor in the pathogenesis of thromboembolic complications [6]. Although the mechanisms of complement activation in APS are not fully understood, it is hypothesized that complement activation by antiphospholipid antibodies results in C5 cleavage to form C5a and C5b activated factors; C5a then promotes the production of tissue factor by neutrophils, which, in turn, determines the procoagulant activity and inhibits fibrinolysis [7, 8].

The genetic predisposition to NIE in APS patients remains a complex and poorly understood issue. Associations of DR or DQ (groups of histocompatibility antigens) with the development of APS and genetic risks of aCL production in $\beta 2$ -GPI polymorphism with the substitution of valine (247) for leucine have been reported [9]. There is little data on the association of single nucleotide polymorphisms in the genes of hemostasis and the folate cycle with the development of endocarditis in APS [10, 11].

AIM OF THE RESEARCH

Revealing of possible associations between polymorphisms of 18 candidate genes and non-infectious endocarditis in patients with APS, as well as the development of possible thromboembolic complications.

MATERIALS AND METHODS

The study included 35 patients (32 women, 3 men) aged 43.0 ± 13.9 years with NIE. At the same time, the main signs characterizing NIE in APS were negative blood culture, normothermia, and the absence of obvious echoscopic signs of infection (thickening and induration of valve leaflets, minimal regurgitation). Primary APS was diagnosed in 15 patients (18.5%), secondary – in 20 patients with autoimmune pathology (24.7%). Criteria for inclusion in the study: the presence of endocarditis in APS. All patients were examined for autoimmune pathology (APS, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, scleroderma, mixed connective tissue disease). Rheumatological diseases were diagnosed in accordance with modern international APS criteria [1, 4]. The presence of APS signs in patients without an autoimmune disease, neoplastic or infectious origin of the disease served as the basis for determining the primary APS (there were no reliable clinical and serological markers of the previously listed diseases). The diagnosis of NIE was made after the exclusion of infectious origin of

мия, смешанное заболевание соединительной ткани). Ревматологические заболевания диагностировали в соответствии с современными международными критериями АФС [1, 4]. Наличие признаков АФС у пациентов без аутоиммунного заболевания, неопластического или инфекционного генеза заболевания служило основанием для определения первичного АФС (отсутствовали достоверные клинические и серологические маркеры ранее перечисленных заболеваний). Диагноз НЭ был поставлен после исключения инфекционного генеза эндокардита согласно критериям Duke [12]: отрицательные данные бактериологических исследований, нормотермия и отсутствие эхокардиографических признаков инфицирования клапанов. При НЭ выявлялись лишь утолщение и уплотнение створок клапанов, незначительная регургитация, кроме того, не наблюдалось прогрессирования порока сердца и других осложнений инфекционного эндокардита, таких как отрывы, разрывы, перфорации и абсцедирование створок клапанов. Критерии исключения: беременность и недавно перенесенные острые состояния (травма, полихимиотерапия, хирургическое вмешательство). Информированное согласие было подписано всеми пациентами в соответствии с этическими стандартами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека». В контрольную группу вошли 225 условно здоровых людей аналогичного возраста.

В работе использовались инструментальные методы исследования: рентгенография органов грудной клетки, эхокардиография, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, почек. Данные ангиопульмографии, мультиспиральной компьютерной томографии головного мозга были получены с использованием томографа Siemens Somatom Emotion 16 (Siemens, Германия).

Тромбоз глубоких вен, артериальные тромбозы были диагностированы с помощью ультразвукового исследования сосудов. Ультразвуковое исследование сердца и сосудов проводили на аппарате Sonoline G60 S (Siemens, США), в одномерном (М-тип) и двумерном (В-тип) режимах, с помощью импульсной и непрерывно-волновой доплерографии.

Геномную ДНК выделяли из 6–10 мл венозной крови, с помощью фенол-хлороформного метода. Полиморфизмы генов системы гемостаза и фолатного цикла тестировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на тест-системах производства

endocarditis according to the Duke criteria [12]: negative bacteriological data, normothermia, and the absence of echoscopic signs of valve infection. In NIE, only thickening and induration of the valve leaflets, slight regurgitation were detected, in addition, there was no progression of heart disease and other complications of infective endocarditis, such as detachment, ruptures, perforations of the valve leaflets, and local abscess formation. Exclusion criteria: pregnancy and recent acute conditions (trauma, polychemotherapy, surgery). Informed consent was signed by all patients in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki of the World Medical Association: Ethical Principles for Medical Research Involving Humans. The control group included 225 apparently healthy people of the same age.

Instrumental examination methods were used in the study: chest radiography, echocardiography, abdominal and kidneys ultrasonography. The data of angiopulmography, multislice computed tomography of the brain were obtained using a Siemens Somatom Emotion 16 tomograph (Siemens, Germany).

Deep vein thrombosis, arterial thrombosis were diagnosed by ultrasound examination of vessels. Ultrasound examination of the heart and blood vessels was performed using a Sonoline G60 S device (Siemens, USA), in M-type and B-type modes, using pulsed and continuous-wave Doppler sonography.

Genomic DNA was isolated from 6–10 ml of venous blood using the phenol-chloroform extraction. Polymorphisms of the genes of the hemostatic system and the folate cycle were tested using real-time polymerase chain reaction (PCR) and DNA Technology (Russia) kits: rs6046 (10976 G>A) of the *F7* gene, rs5985 (103G>T) of the gene *F13*, rs1800790 (-455 G>A) of the *FGB* gene, rs1799963 (20210 G>A) of the *F2* gene, rs6025 (1691 G>A) of the *F5* gene, rs1126643 (807 C>T) of the *ITGA2* gene, rs5918 (1565 T>C) of the *ITGB3* gene, rs1799889 (-675 5G>4G) of the *PAI-1* gene (*SERPINE1*), rs1801131 (1298 A>C) of the *MTHFR* gene, rs1801133 (677 C>T) of the *MTHFR* gene, rs1805087 (2756 A>G) of the *MTR* gene, rs1801394 (66 A>G) of the *MTRR* gene. Polymorphisms of the *NOS3* (4a/4b) and *ACE* (rs1799752) genes were tested by PCR with flanking primers; polymorphisms of the *CTLA4* (rs231775), *MMP9* (rs11697325), *PTPN22* (rs2476601) and *IL6* (rs1800795) genes – using PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism). Genotyping was carried out at the Research Institute of Internal and Preventive Medicine (Novosibirsk, Russia).

«ДНК-технология» (Россия): rs6046 (10976 G>A) гена *F7*, rs5985 (103G>T) гена *F13*, rs1800790 (-455 G>A) гена *FGB*, rs1799963 (20210 G>A) гена *F2*, rs6025 (1691 G>A) гена *F5*, rs1126643 (807 C>T) гена *ITGA2*, rs5918 (1565 T>C) гена *ITGB3*, rs1799889 (-675 5G>4G) гена *PAI-1* (*SERPINE1*), rs1801131 (1298 A>C) гена *MTHFR*, rs1801133 (677 C>T) гена *MTHFR*, rs1805087 (2756 A>G) гена *MTR*, rs1801394 (66 A>G) гена *MTRR*. Полиморфизмы генов *NOS3* (4a/4b) и *ACE* (rs1799752) тестировали с помощью ПЦР с фланкирующими праймерами; полиморфизмы генов *CTLA4* (rs231775), *MMP9* (rs11697325), *PTPN22* (rs2476601) и *IL6* (rs1800795) – с помощью ПЦР ПДРФ (полиморфизма длин рестрикционных фрагментов). Генотипирование выполняли в НИИ терапии и профилактической медицины – филиале Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (Новосибирск, Россия).

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ SPSS, версия 21.0. Распределение частот генотипов всех однонуклеотидных полиморфизмов в контрольной группе соответствовало равновесию Харди – Вайнберга. Расчет величины отношения шансов (ОШ) проводили по методу Вульфа – Холдейна, который допускает расчеты по таблице 2×2 для случаев, когда хотя бы одна из ячеек таблицы имеет значение «ноль». Достоверность различий частот изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по критерию χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность и по двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц – PTMF2. Для оценки развития тромбоэмболических осложнений (ТЭО) был проведен бивариантный логистический регрессионный анализ. Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

АФС был подтвержден в соответствии с диагностическими критериями, проводился клинический и иммунологический скрининг в 100 % случаев. В группе пациентов с НЭ отмечались патологические изменения со стороны нервной, сердечно-сосудистой системы, тромбоз сосудов плаценты. Отличительной особенностью НЭ было течение рецидивирующих тромбозов, артериальные тромбозы следовали один за другим в 100 % случаев, таким образом, у одной пациентки частота рецидивирования острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК) достигала восьми эпизодов (каждый последующий инсульт протекал тяжелее, требовался более длительный

Statistical analysis was performed using the SPSS software package, version 21.0. The distribution of genotype frequencies of all single nucleotide polymorphisms in the control group corresponded to the Hardy-Weinberg equilibrium. The calculation of the odds ratio (OR) was carried out according to the Woolf-Haldane test, which allows calculations according to the 2×2 table for cases where at least one of the table cells has the zero value. Significance of differences in the frequencies of the studied traits in alternative groups was determined by the χ^2 test with a Yates' continuity correction and by the two-sided version of the Fisher's exact test for four-field tables – PTMF2. To assess the development of thromboembolic complications (TEC), a bivariate logistic regression analysis was performed. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

APS was confirmed according to diagnostic criteria; clinical and immunological screening was performed in 100% of cases. In the group of patients with NIE, there were pathological changes in the nervous and cardiovascular systems, thrombosis of the placental vessels. A distinctive feature of NIE was the course of recurrent thrombosis, one episode of arterial thrombosis occurred after another in 100% of cases, thus, in one patient, the frequency of recurrence of acute cerebrovascular accident (ACVA) reached eight episodes (each subsequent stroke was more severe, a longer recovery period was required). In 25% of cases, obstetric failure was noted (recurrent miscarriage in the second and third trimester (detected in one third of women with NIE), recurrent spontaneous abortions, intrauterine fetal death, preeclampsia, preterm birth ($p = 0.01$)). The development of various neurological manifestations aroused our greatest interest: thrombosis of intracerebral arteries leading to stroke, transient ischemic attack without significant neurological disorders, convulsive syndrome with multi-infarct dementia (at later stages and in elderly patients), and mental disorders (depressive states). The most significant TEC of non-infectious endocarditis were ischemic stroke and myocardial infarction – 23.47 and 8.64% of cases, respectively.

As for ultrasound examination, the damage to the heart valves is associated with the presence of aCL, and is characterized by minimal changes – minor regurgitation, thickening of the valve leaflets, small and mobile vegetations, which is typical for NIE.

восстановительный период). В 25 % случаев отмечались акушерская патология (привычное невынашивание беременности во втором и третьем триместре (выявлено у трети женщин с НЭ), рецидивирующие спонтанные аборт, внутриутробная гибель плода, преэклампсия, преждевременные роды ($p = 0.01$)). Наибольший интерес вызвало развитие разнообразных неврологических проявлений: тромбоз внутримозговых артерий, приводящий к инсульту; транзиторная ишемическая атака без ярких неврологических нарушений; судорожный синдром с мультиинфарктной деменцией (на более поздних стадиях и у пожилых пациентов) и психическими нарушениями (депрессивными состояниями). Наиболее значимыми ТЭО неинфекционного эндокардита были ишемический инсульт и инфаркт миокарда – 23.47 и 8.64 % случаев соответственно.

Эхокардиографически поражение клапанов сердца ассоциировано с наличием АКЛ и характеризовалось минимальными изменениями – незначительная регургитация, утолщение створок клапанов, мелкие и подвижные вегетации, что характерно для НЭ. Для пациентов с НЭ характерно многоклапанное поражение митрального (88.8 % случаев) и аортального (51.3 %) клапанов ($p = 0.03$).

При эндокардитах неинфекционного генеза у пациентов развиваются синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания, гиперкоагуляция, тромбоцитопения и гипергомоцистеинемия. С наличием в крови ВА и антител к кардиолипину ассоциируется склонность к ТЭО, вследствие наличия поражения сердечных клапанов, их деформации и растяжения тромботическими массами. Средние значения BA_1 и BA_2 у пациентов с НЭ составили 1.07 ± 0.21 и 1.04 ± 0.19 соответственно (диагностически значимый уровень ВА – более 1.09). Причинами нарушения микроциркуляции являются микротромбозы, ремоделирование микрососудов (изменяется геометрия сосудов). Гиперфибриногенемия (4.24 ± 1.3 г/л) является самостоятельным фактором изменения реологических свойств крови как компонент плазменного гемостаза.

При изучении роли полиморфизмов 18 генов-кандидатов в развитии НЭ выявлено, что полиморфизмы rs6025 (1691 G>A) гена *F5*, 4a/4b гена *NOS3*, rs1800795 гена *IL6*, rs1805087 (2756 A>G) гена *MTR* достоверно ассоциированы с развитием клапанного поражения. Как известно, нарушение фолатного цикла способствует гипергомоцистеинемии, что может приводить к гиперкоагуляции и формированию тромботических масс на сердечных клапанах [13]. Ген *MTR* кодирует

Patients with NIE are characterized by multivalvular damage of the mitral (88.8% of cases) and aortic (51.3%) valves ($p = 0.03$).

Patients with non-infectious endocarditis develop a syndrome of disseminated intravascular coagulation, hypercoagulability, thrombocytopenia and hyperhomocysteinemia. The presence of LA and antibodies to cardiolipin in blood is associated with a tendency to TEC, due to the existing damage to the heart valves, their deformation and distension by thrombotic masses. The mean values of LA_1 and LA_2 in patients with NIE were 1.07 ± 0.21 and 1.04 ± 0.19 , respectively (the diagnostically significant level of LA was more than 1.09). The causes of microcirculation disorders are microthrombosis, remodeling of microvessels (changes in the geometry of vessels). Hyperfibrinogenemia (4.24 ± 1.3 g/l) is an independent factor in changes in the rheological properties of blood as a component of plasma hemostasis.

When studying the role of polymorphisms of 18 candidate genes in the development of NIE, it was found that polymorphisms rs6025 (1691 G>A) of the *F5* gene, 4a/4b of the *NOS3* gene, rs1800795 of the *IL6* gene, rs1805087 (2756 A>G) of the *MTR* gene are significantly associated with the development of valvular lesions. As is known, folate cycle disturbance contributes to hyperhomocysteinemia which can lead to hypercoagulability and the formation of thrombotic masses on the heart valves [13]. The *MTR* gene encodes the amino acid sequence of methionine synthase, one of the key enzymes of methionine metabolism, catalyzing the formation of methionine from homocysteine by its remethylation. Carrying the genotype AA rs1805087 (2756 A>G) of the *MTR* gene more than doubles the risk of developing sterile vegetations and, accordingly, determines the non-infectious genesis of endocarditis (OR = 2.22, 95% confidence interval (CI) 1.11–4.45, $p = 0.03$) (Fig. 1).

In the presence of the Leiden mutation, the coagulation factor V (FV) is not cleaved by the physiological anticoagulant protein C which leads to an increase in the concentration of F5 in the blood serum. The number of carriers of the FV Leiden mutation (genotype GA) was significantly increased in NIE (8.9 vs. 3.6% in the control group, $p = 0.04$) (Fig. 2). Thus, if patients with NIE have the FV Leiden mutation, it can be argued that GA polymorphism is associated with the formation of vegetations on the valvular heart apparatus. Taking into account the fact that results may affect the treatment and prognosis, the genetic testing is indicated for relatives of NIE patients from risk

аминокислотную последовательность метионин-синтазы – одного из ключевых ферментов обмена метионина, катализирующего образование метионина из гомоцистеина путем его реметилирования. Носительство генотипа AA rs1805087 (2756 A>G) гена *MTR* более чем в 2 раза увеличивает риск развития «стерильных» вегетаций и соответственно определяет неинфекционный генез эндокардита (ОШ = 2.22, 95% доверительный интервал (ДИ) 1.11–4.45, $p = 0.03$) (рис. 1).

При наличии мутации Лейден фактор свертывания 5 (F5) не расщепляется физиологическим антикоагулянтом С, что приводит к повышению концентрации F5 в сыворотке крови. Количество носителей мутации Лейден (генотип GA) достоверно увеличено при НЭ (8.9 против 3.6 % в контрольной группе, $p = 0.04$) (рис. 2). Таким образом, при наличии у пациентов с НЭ мутации Лейден можно утверждать, что полиморфизм GA ассоциирован с формированием вегетаций на клапанном аппарате сердца. Учитывая тот факт, что результаты могут повлиять на лечение и прогноз, генетическое обследование показано родственникам пациентов с НЭ из группы риска (гормональная контрацепция, беременность, в семьях с рецидивирующими венозными тромбозами в молодом возрасте).

Как ранее было подтверждено, избыточная продукция протромбина является фактором риска инфаркта миокарда, венозных тромбозов, в том числе тромбоэмболии легочной артерии, часто имеющей смертельный исход. Также является дискуссионным вопросом роль полимор-

groups (hormonal contraception, pregnancy, family history of recurrent venous thrombosis at a young age).

As previously confirmed, an excessive production of prothrombin is a risk factor for myocardial infarction, venous thrombosis, including pulmonary embolism, which is often fatal. The role of the rs1799963 (20210 G>A) polymorphism of the *F2* gene in the development of arterial thrombosis is also a debatable issue [14]. Among our patients with NIE, there were no carriers of the prothrombogenic polymorphism AG of the *F2* gene.

The *IL6* gene encodes the interleukin-6 protein, which is involved in the development of the immune response, triggering the acute phase of inflammation. The CC genotype indicates a significantly reduced expression of the *IL6* gene. Presumably, in the case of damage to the valvular heart apparatus in APS, an excessive production of IL-6 due to an autoimmune reaction causes valvulitis, followed by the formation of sterile vegetations. We have shown that the NIE group is characterized by a decrease in the frequency of the CC genotype (OR = 0.28, 95% CI 0.08–0.96, $p = 0.03$). Accordingly, the CC genotype can be considered conditionally protective against the non-infectious endocarditis development.

In the study of polymorphisms of the *NOS3* synthase gene, the frequency of carriage of the 4b/4b genotype of the *NOS3* gene in the group of healthy individuals was higher than in patients with endocarditis, i.e. the presence of the 4b/4b genotype of the *NOS3* gene reduces the likelihood of developing

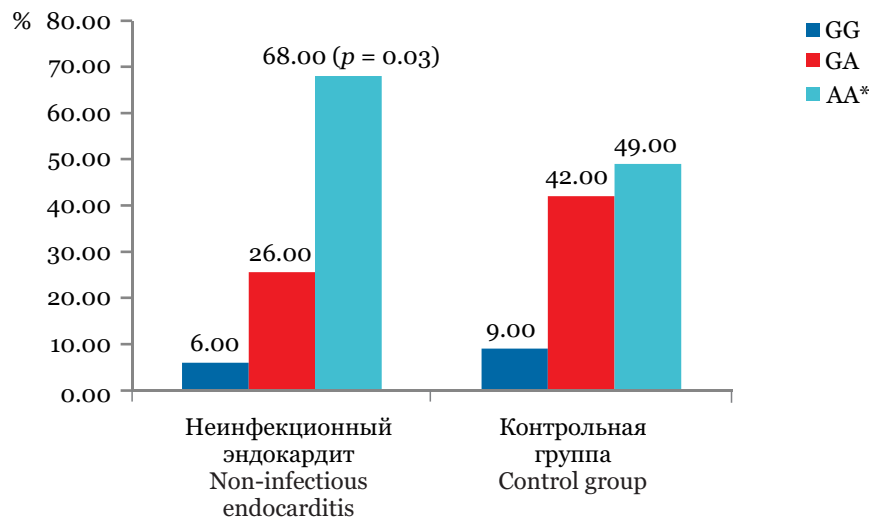


Рис. 1. Частоты генотипов полиморфизма rs1805087 (2756 A>G) гена *MTR* в контрольной группе и в группе с неинфекционным эндокардитом (* $p < 0.05$)
Fig. 1. Frequency rate of genotypes of rs1805087 polymorphism (2756 A>G) of the *MTR* gene in the control group and in the group with non-infectious endocarditis (* $p < 0.05$)

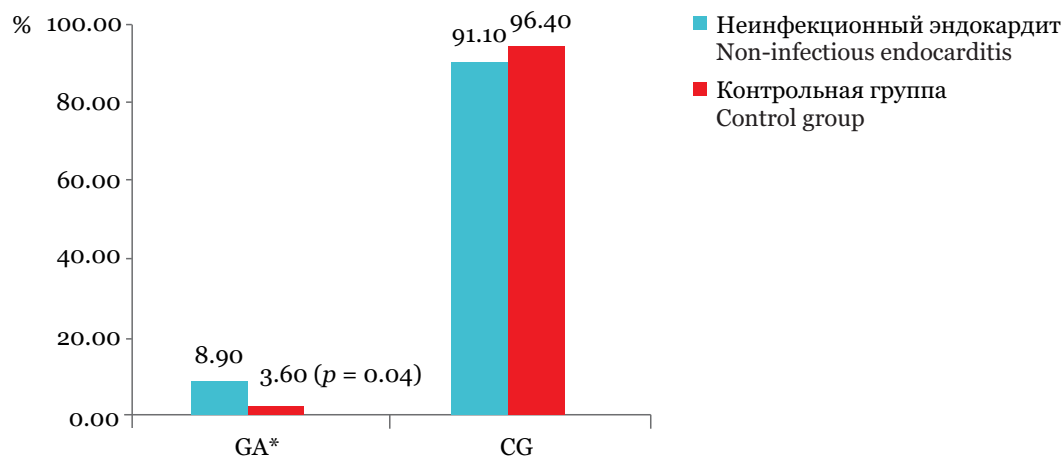


Рис. 2. Частоты генотипов полиморфизма rs6025 (1691 G>A) гена *F5* в контрольной группе и в группе с неинфекционным эндокардитом (* $p < 0.05$)
Fig. 2. Frequency rate of genotypes of rs6025 (1691 G>A) polymorphism of the *F5* gene in the control group and in the group with non-infectious endocarditis (* $p < 0.05$)

физма rs1799963 (20210 G>A) гена *F2* в развитии артериального тромбоза [14]. Среди наших пациентов с НЭ носителей протромбогенного полиморфизма AG гена *F2* не оказалось.

Ген *IL6* кодирует белок интерлейкин-6, который участвует в развитии иммунного ответа, запускающая острую фазу воспаления. Генотип CC свидетельствует о значительно сниженной экспрессии гена *IL6*. Предположительно в случае поражения клапанного аппарата сердца при АФС избыточная продукция IL-6 вследствие аутоиммунной реакции вызывает вальвулит с последующим формированием «стерильных» вегетаций. Нами показано, что для группы НЭ характерно снижение частоты генотипа CC (ОШ = 0.28, 95% ДИ 0.08–0.96, $p = 0.03$). Соответственно, генотип CC можно считать условно протективным в развитии эндокардита неинфекционной природы.

При исследовании полиморфизмов гена синтазы *NOS3* частота носительства генотипа 4b/4b гена *NOS3* в группе здоровых лиц оказалась выше, чем у пациентов с эндокардитами, т.е. наличие генотипа 4b/4b гена *NOS3* уменьшает вероятность развития НЭ (ОШ = 0.44, 95% ДИ 0.22–0.9, $p = 0.03$) (рис. 3). Таким образом, снижение содержания оксида азота нарушает нормальное функционирование сосудов, повышает тонус сосудистой стенки и усиливает тромбообразование, а увеличение активности *NOS3* является протективным фактором в развитии НЭ.

Среди тромбоэмболических осложнений неинфекционного эндокардита наиболее часто отмечается ишемическое поражение головного мозга. Риск ТЭО ассоциирован с размерами и

НЭ (OR = 0.44, 95% CI 0.22–0.9, $p = 0.03$) (Fig. 3). Thus, a decrease in the content of nitric oxide disrupts the normal functioning of blood vessels, increases the tone of the vascular wall and enhances thrombosis, while an increase in *NOS3* activity is a protective factor in the development of NIE.

Among the thromboembolic complications of non-infectious endocarditis, ischemic brain lesion is the most often noted. The risk of TEC is associated with the size and mobility of vegetations, hereditary burden and the presence of recurrent thrombosis. According to the logistic regression data, we revealed associations of polymorphisms rs1126643 (807 C>T) of the *ITGA2* gene (OR = 2.09, 95% CI 1.14–3.85, $p = 0.02$) and rs1799889 (-675 5G>4G) of the *PAI-1* gene (*SERPINE1*) with the development of thromboembolic complications (ACVA) at NIE (OR = 4.12, CI 1.25–13.63, $p = 0.02$).

Thus, we have identified polymorphisms of candidate genes that determine the clinical and hemostasiological characteristics of non-infectious endocarditis and contribute to the assessment of the risk of its development.

CONCLUSION

Among the candidate genes of non-infectious endocarditis, the polymorphisms rs6025 (1691 G>A) of the *F5* gene, rs1805087 (2756 A>G) of the *MTR* gene (folate cycle) turned out to be significant. Among conditionally protective candidate genes of non-infectious endocarditis, polymorphisms 4a/4b of the *NOS3* gene, rs1800795 of the *IL6* gene have shown their significance. Given the course of hypercoagulation and hyperaggregation, one third of patients may be at risk of developing thromboem-

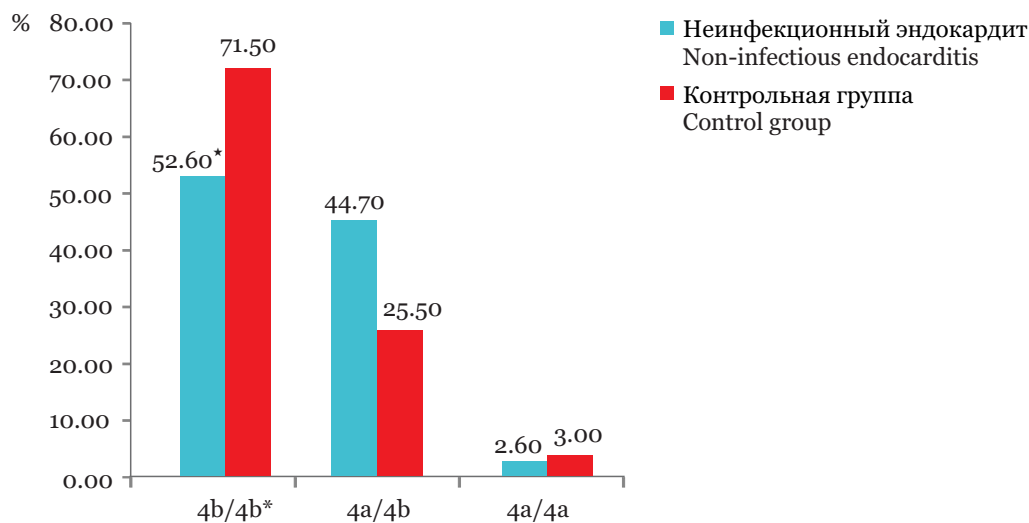


Рис. 3. Частоты генотипов 4a/4b гена *NOS3* в контрольной группе и в группе с неинфекционным эндокардитом (* $p < 0.05$; * $p < 0.03$)
Fig. 3. Frequency rates of 4a/4b genotypes of the *NOS3* gene in the control group and in the group with non-infectious endocarditis (* $p < 0.05$; * $p < 0.03$)

подвижностью вегетаций, наследственной отягощенностью и наличием рецидивирующего характера тромбозов. По данным логистической регрессии нами установлены ассоциации полиморфизмов rs1126643 (807 C>T) гена *ITGA2* (ОШ = 2.09, 95% ДИ 1.14–3.85, $p = 0.02$) и rs1799889 (-675 5G>4G) гена *PAI-1* (*SERPINE1*) с развитием тромбоэмболических осложнений (ОНМК) при НЭ (ОШ = 4.12, ДИ 1.25–13.63, $p = 0.02$).

Таким образом, нами выявлены полиморфизмы генов-кандидатов, определяющие клиничко-гемостазиологические характеристики неинфекционного эндокардита и способствующие оценке риска его развития.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди генов-кандидатов неинфекционного эндокардита значимыми оказались полиморфизмы rs6025 (1691 G>A) гена *F5*, rs1805087 (2756 A>G) гена *MTR* (фолатного цикла). Среди условно протективных генов-кандидатов неинфекционного эндокардита показали свою значимость полиморфизмы 4a/4b гена *NOS3*, rs1800795 гена *IL6*. Учитывая течение гиперкоагуляции и гиперагрегации, у трети пациентов возможен риск развития тромбоэмболических осложнений. Для 2 полиморфизмов – rs1126643 (807 C>T) гена *ITGA2* и rs1799889 (-675 5G>4G) гена *PAI1* (*SERPINE1*) выявлена ассоциация с тромбоэмболическими осложнениями (острое нарушение мозгового кровообращения) при НЭ. Таким образом, одним из направлений в созда-

тельном осложнениях. Two polymorphisms, rs1126643 (807 C>T) of the *ITGA2* gene and rs1799889 (-675 5G>4G) of the *PAI1* gene (*SERPINE1*), were found to be associated with thromboembolic complications (acute cerebrovascular accident) in NIE. Thus, one of the directions in creating a panel of risk markers for the development of TEC in endocarditis is the study of the parameters of the hemostatic system. Additional research is needed to better understand the effect of aCL on the activation of factors contributing to the development of thrombosis, to find more accurate prognostic biomarkers to identify patients with the highest risk of thromboembolic complications associated with the presence of APS. It is advisable to perform genotyping of some single nucleotide polymorphisms in patients with APS (at risk for developing non-infectious endocarditis).

Financing. The research was carried out according to the State task within the framework of the budget topic of the Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences No. AAAA-A17-117112850280-2. The work was partially supported by budget projects No. 0324-2018-0002 and No. 0324-2017-0048 (isolation and storage of DNA, genotyping of single nucleotide polymorphisms).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

нии панели маркеров риска развития ТЭО при эндокардитах является исследование параметров системы гемостаза. Необходимы дополнительные исследования, которые позволят лучше понять влияние АКЛ на активацию факторов, способствующих развитию тромбозов, найти более точные прогностические биомаркеры для выявления пациентов с наибольшим риском тромбозомболических осложнений, ассоциированных с наличием АФС. Целесообразно проводить генотипирование некоторых однонуклеотидных полиморфизмов у пациентов с АФС (группы риска развития неинфекционного эндокардита).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lopes M.R.U., Danowski A., Funke A. et al. Update on antiphospholipid antibody syndrome // *Rev. Assoc. Med. Bras.* (1992). 2017;63(11):994–999. DOI: 10.1590/1806-9282.63.11.994.
2. Gaddh M., Cheng E., Elsebaie M.A.T., Bodó I. Clinical utilization and cost of thrombophilia testing in patients with venous thromboembolism // *TH Open.* 2020;4(3):e153–e162. DOI: 10.1055/s-0040-1714334.
3. Sciascia S., Amigo M.C., Roccatello D., Khamashta M. Diagnosing antiphospholipid syndrome: 'extra-criteria' manifestations and technical advances // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017;13(9):548–560. DOI: 10.1038/nrrheum.2017.124.
4. Fanouriakis A., Kostopoulou M., Alunno A. et al. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus // *Ann. Rheum. Dis.* 2019;78(6):736–745. DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-21508.
5. Foley J.H., Walton B.L., Aleman M.M. et al. Complement activation in arterial and venous thrombosis is mediated by plasmin // *eBioMed.* 2016;5:175–182. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.02.011.
6. Tedesco F., Borghi M.O., Gerosa M. et al. Pathogenic role of complement in antiphospholipid syndrome and therapeutic implications // *Front. Immunol.* 2018;9:1388. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01388.
7. Chaturvedi S., Brodsky R.A., McCrae K.R. Complement in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome // *Front. Immunol.* 2019;10:449. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00449.
8. Grosso G., Vikerfors A., Woodhams B. et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) – A possible link between coagulation and complement activation in the antiphospholipid syndrome (APS) // *Thromb. Res.* 2017;158:168–173. DOI: 10.1016/j.thromres.2017.06.028.
9. Castro-Marrero J., Balada E., Vilardell-Tarrés M., Ordi-Ros J. Genetic risk factors of thrombosis in the antiphospholipid syndrome // *Br. J. Haematol.* 2009;147(3):289–296. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07831.x.
10. Sun G., Jia Y., Meng J. et al. A genetic risk factor for thrombophilia in a Han Chinese family // *Mol.*

Финансирование. Работа выполнена по Государственному заданию в рамках бюджетной темы Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» № АААА-А17-117112850280-2. Работа частично поддержана бюджетными проектами № 0324-2018-0002 и 0324-2017-0048 (выделение и хранение ДНК, генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

REFERENCES

1. Lopes M.R.U., Danowski A., Funke A. et al. Update on antiphospholipid antibody syndrome. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2017;63(11):994–999. DOI: 10.1590/1806-9282.63.11.994.
2. Gaddh M., Cheng E., Elsebaie M.A.T., Bodó I. Clinical utilization and cost of thrombophilia testing in patients with venous thromboembolism. *TH Open.* 2020;4(3):e153–e162. DOI: 10.1055/s-0040-1714334.
3. Sciascia S., Amigo M.C., Roccatello D., Khamashta M. Diagnosing antiphospholipid syndrome: 'extra-criteria' manifestations and technical advances. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017;13(9):548–560. DOI: 10.1038/nrrheum.2017.124.
4. Fanouriakis A., Kostopoulou M., Alunno A. et al. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 2019;78(6):736–745. DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-21508.
5. Foley J.H., Walton B.L., Aleman M.M. et al. Complement activation in arterial and venous thrombosis is mediated by plasmin. *eBioMed.* 2016;5:175–182. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.02.011.
6. Tedesco F., Borghi M.O., Gerosa M. et al. Pathogenic role of complement in antiphospholipid syndrome and therapeutic implications. *Front. Immunol.* 2018;9:1388. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01388.
7. Chaturvedi S., Brodsky R.A., McCrae K.R. Complement in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Front. Immunol.* 2019;10:449. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00449.
8. Grosso G., Vikerfors A., Woodhams B. et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) – A possible link between coagulation and complement activation in the antiphospholipid syndrome (APS). *Thromb. Res.* 2017;158:168–173. DOI: 10.1016/j.thromres.2017.06.028.
9. Castro-Marrero J., Balada E., Vilardell-Tarrés M., Ordi-Ros J. Genetic risk factors of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Br. J. Haematol.* 2009;147(3):289–296. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07831.x.
10. Sun G., Jia Y., Meng J. et al. A genetic risk factor for thrombophilia in a Han Chinese family. *Mol. Med. Rep.* 2017;15(4):1668–1672. DOI: 10.3892/mmr.2017.6217.

- Med. Rep. 2017;15(4):1668–1672. DOI: 10.3892/mmr.2017.6217.
11. Hirmerova J., Seidlerova J., Subrt I., Slechtova J. Thrombophilia testing results in patients with a first venous thromboembolic event: should the selection criteria for testing be revisited? // *Int. Angiol.* 2017;36(2):167–173. DOI: 10.23736/S0392-9590.16.03679-8.
 12. Habib G., Lancellotti P., Antunes M.J. et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM) // *Eur. Heart J.* 2015;36(44):3075–3128. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv319.
 13. Hmimech W., Idrissi H.H., Diakite B. et al. Association of C677T MTHFR and G20210A FII prothrombin polymorphisms with susceptibility to myocardial infarction // *Biomed. Rep.* 2016;5(3):361–366. DOI: 10.3892/br.2016.717.
 14. Yoon U., Kwok L., Flessenkaemper I. Bilateral superficial femoral artery thrombosis in a 15-year-old caucasian male with homozygous prothrombin G20210A genotype and associated antiphospholipid syndrome // *Int. J. Angiol.* 2016;25(5):e100–e105. DOI: 10.1055/s-0035-1548557.
 15. Hirmerova J., Seidlerova J., Subrt I., Slechtova J. Thrombophilia testing results in patients with a first venous thromboembolic event: should the selection criteria for testing be revisited? *Int. Angiol.* 2017;36(2):167–173. DOI: 10.23736/S0392-9590.16.03679-8.
 16. Habib G., Lancellotti P., Antunes M.J. et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur. Heart J.* 2015;36(44):3075–3128. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv319.
 17. Hmimech W., Idrissi H.H., Diakite B. et al. Association of C677T MTHFR and G20210A FII prothrombin polymorphisms with susceptibility to myocardial infarction // *Biomed. Rep.* 2016;5(3):361–366. DOI: 10.3892/br.2016.717.
 18. Yoon U., Kwok L., Flessenkaemper I. Bilateral superficial femoral artery thrombosis in a 15-year-old caucasian male with homozygous prothrombin G20210A genotype and associated antiphospholipid syndrome. *Int. J. Angiol.* 2016;25(5):e100–e105. DOI: 10.1055/s-0035-1548557.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бахарева Юлия Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории клинико-популяционных и профилактических исследований терапевтических и эндокринных заболеваний Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия.

Максимов Владимир Николаевич – д-р мед. наук, заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия.

Чапаева Наталья Николаевна – д-р мед. наук, профессор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия.

ABOUT THE AUTHORS

Yulia S. Bakhareva – Junior Researcher, Laboratory of Clinical, Population based and Preventive Research on Internal and Endocrine Diseases, Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia.

Vladimir N. Maksimov – Dr. Sci. (Med.), Head, Laboratory of Molecular and Genetic Research of Internal Diseases, Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia.

Natalya N. Chapaeva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Hospital Therapy, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.